

新規実験系を用いた α IIb β 3 シグナル機構の解析とその病態への影響に関する検討

柏木浩和

大阪大学医学部附属病院 輸血部 血液・腫瘍内科

【研究の背景】

動脈硬化を基盤とした心筋梗塞や脳梗塞などの血管病変形成において血小板は中心的役割を果たす。また、血小板は癌の増殖・転移や免疫機構など、幅広い病態に関与することが明らかにされてきており、血小板活性化の制御機構を明らかにすることは多様な疾患への新たな治療戦略の開発につながる。血小板機能の主たる部分は各種アゴニスト受容体からの活性化シグナル(インサイド-アウトシグナル)によるインテグリン α IIb β 3 のリガンド結合能の獲得および α IIb β 3 へのリガンド結合後に血小板内に誘導される細胞内シグナルによるが、これらシグナルの分子機構の詳細は不明である。また、我々は近年、 α IIb β 3 異常が血小板減少に関連する可能性を示しており、 α IIb β 3 は血小板産生にも関与している可能性が示唆されている。

【目 的】

α IIb β 3 活性化に関与する分子メカニズムおよびその臨床的意義を、 α IIb β 3 変異導入マウスなどを用いて明らかにすることにより、 α IIb β 3 の血小板産生を含めた新たな病態への影響を明らかにする。

【方 法】

先天性巨大血小板減少症を認めた家系の血小板膜蛋白発現および遺伝子解析を行った。その結果、明らかになった新たな α IIb β 3 異常に関し、発現実験系およびノックインマウスを用いた解析を行った。

【結 果】

症例は13歳女性。生下時より6~8万/ μ L程度の血小板減少を指摘、母、伯母、従兄も血小板減少を認めた。患者血小板は大小不同を認め、フローサイトメリーでFSCが健常者と比べ30%程度増大していた。患者血小板で α IIb β 3とGPVIの発現が健常者の60%程度に低下していた。未刺激での α IIb β 3活性化は認めず、各種アゴニストで刺激した際のPAC-1結合は軽度障害されていた。母、伯母、従兄にも患者と同程度の血小板サイズの増大、 α IIb β 3、およびGPVIの発現低下が見られ、全員に β 3 cytoplasmic regionの変異 β 3(R734C)を認めた。GPVIに遺伝子変異は見られなかった。

β 3(R734C)を293T細胞に発現させたところ、 α IIb β 3の恒常的な活性化は認められなかった。次に、 β 3(R734C)ノックインマウス(R734Cマウス)を作製した。野生型、R734Cホモマウスにおける血小板数はそれぞれ平均で109.5万/ μ L、44.5万/ μ Lと明らかな低下を認めた。末梢血塗抹標本およびフローサイトメリーによりR734Cホモマウスにおいて血小板サイズの増加を認めた。血小板膜糖蛋白発現をフローサイトメリーおよびウェスタンブロットで評価したところ、 α IIb β 3のみならずGPVIについてもR734Cホモマウスにおいて低下を認めた。また変異発現細胞において α IIb β 3のリガンドであるフィブリノゲン上での細胞伸展の障害が示唆された。

【考 察】

従来、血小板無力症患者や α IIb β 3 欠損マウス、 α IIb β 3 欠損犬の血小板数は通常正常であることから、 α IIb β 3 は血小板産生には関係しないものと考えられてきたが、近年、先天性巨大血小板性血小板減少症の症例において α IIb および β 3 の遺伝子変異が複数報告され、 α IIb β 3 関連血小板減少症として知られるようになってきた。従来報告されている変異は α IIb β 3 の膜近傍領域にあり、 α IIb β 3 の恒常的活性化を示すという特徴があり、我々は α IIb β 3 の恒常的活性化シグナルが巨核球からの proplatelet 産生に影響を与えることを明らかにしている^{1,2)}。しかし、今回我々が明らかにした新たな β 3 変異、 β 3(R734C)、は患者血小板および発現実験において α IIb β 3 の恒常的な活性化を誘導せず、新たなメカニズムにより血小板減少を誘発していると考えられる。実際に本変異が血小板減少を誘導するのか、またその機序を明らかにするため本研究において β 3(R734C)ノックインマウスの作成を行い、ホモマウスを得ることに成功した。ノックインマウスにおいてヒトと同様の血小板減少が確認されたこと、また α IIb β 3 および GPVI の発現低下が確認されたことから、今後、このマウスを用いてインテグリン細胞内変異とこれら病態との関連を解明することが可能となった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

新たな α IIb β 3 変異による血小板減少症が明らかとなった。本遺伝子異常は従来の α IIb β 3 関連血小板減少症で認められる α IIb β 3 活性化変異と異なるメカニズムで血小板減少を来している可能性がある。さらに α IIb β 3 だけでなく GPVI の発現低下も認めたことは、 α IIb β 3 細胞内領域を制御することにより、多様な血小板機能に影響を与えることを示唆している。今回、作製に成功したノックインマウスの検討を進めることにより、今後、新たな血小板機能制御機構および血小板産生制御機構の解明につながることを期待される。

【参考・引用文献】

1. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 2011;**117**: 5479-84.
2. Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Nishiura N, Banno F, Kokame K, Kato H, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y. Knock-in mice bearing constitutively active α IIb(R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. *J Thromb Haemost* 2020;**18**: 497-509.